



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | Mg, Ca及びZnのヒトアルカリ性ホスファターゼ活性に対する作用                                                 |
| Author(s)        | 半谷, 純一; 鈴木, 邦明; 吉村, 善隆 他                                                          |
| Citation         | 北海道歯学雑誌, 43, 9-18                                                                 |
| Issue Date       | 2022-09-15                                                                        |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/86831">https://hdl.handle.net/2115/86831</a> |
| Type             | journal article                                                                   |
| File Information | 43_03.pdf                                                                         |



## 原 著

## Mg, Ca及びZnのヒトアルカリ性ホスファターゼ活性に対する作用

半谷 純一<sup>1)</sup> 鈴木 邦明<sup>2)</sup> 吉村 善隆<sup>2)</sup> 南川 元<sup>2)</sup>  
 兼平 孝<sup>1)</sup> 本多 丘人<sup>1)</sup>

**抄 録：**ヒトには遺伝子型の異なる4種に加えて糖鎖による修飾が異なる多数のアルカリ性ホスファターゼ (ALP) アイソザイムが存在するが、骨型ALPのピロリン酸及び小腸型ALPのピロドキサルリン酸を除いて生理的な基質と機能に関しては不明な点が多く、また活性の至適pHがアルカリ性である意味も不明である。ヒト胎盤型ALPの結晶構造解析の結果からヒトのALPには1サブユニットあたり1Mg及びCaと2Znの結合部位の存在が示されたが、ALP活性における各イオンの機能については報告が少ない。そこで、ヒトALPアイソザイムに対する各イオンの作用を比較することにより、アイソザイムによる活性の至適pH及び基質への親和性の相違を明らかにすることを目的に研究を行った。市販のヒト骨型、肝臓型、胎盤型及び小腸型ALPを使用した。基質にはパラニトロフェニルリン酸 (pNPP)、Na-PPi及びATPを使用し以下の結果を得た。1) pNPPを基質として、4種類のALP活性はMg, Ca及びZn濃度依存性に増加し、50%活性化濃度はALPの種類にはよらず、Zn, Ca, Mgの順に増加した。Znは低濃度では活性を促進したが、高濃度では逆に抑制し、2個のZn結合部位の性質は異なることを示唆した。また、各ALP活性の至適pHはALP、基質及びイオンの種類により変化した。2) pNPP及びNa-PPiを基質として、骨型ALP活性はMg, Ca及びZn濃度依存性に増加したが、濃度依存曲線は基質によって異なった。3) MgとCaあるいはMgとZnを組み合わせることで添加することにより骨型ALP活性は相加的に増加した。4) イオン及び基質の種類によらず、骨型ALP活性は阻害剤であるlevamisoleあるいはtetramisoleによって濃度依存的に阻害された。以上の結果は*in vitro*では4種類のALPにはMg, Ca及びZn結合部位が存在し独立してALP活性の促進が可能であること、活性の至適pH及び基質に対する親和性は存在するイオンによって変化するを示唆した。*In vivo*でもALPの生体内での基質は存在する2価金属イオンの種類と周囲のpHによって変化する可能性がある。

**キーワード：**アルカリ性ホスファターゼ、ナトリウムピロリン酸、マグネシウム、カルシウム、亜鉛

## 緒 言

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) は大腸菌からヒトまで保存されており、ヒトではほぼ全身に存在して臓器によるアイソザイムが分類される<sup>1,2)</sup>。ヒトALPは、遺伝子レベルで臓器特異的な小腸型、胎盤型、胚細胞型と臓器非特異型である骨型、肝臓型、腎臓型などに分類される。これらのアイソザイムは分子量、熱への安定性、阻害剤への反応性の違いなどの相違点が認められるが、その生理学的な役割に関しては明らかにされていない点が多い<sup>1-6)</sup>。これらのうち、骨型ALPは硬組織石灰化において、石灰化を阻害するピロリン酸を分解すると同時にハイドロキシアパタイトを形成するリンを供給する機能が明らかにされている<sup>7)</sup>。骨芽細胞あるいは石灰化のマーカー酵素とされ、骨芽細胞

への分化、あるいは硬組織形成の指標として測定されることが多い<sup>8,9)</sup>。しかし、生体内での基質がピロリン酸だけなのか、活性の至適pHが10に近いアルカリ性である意味、骨型ALPと他のアイソザイムとの酵素としての相違など不明な点が多く残されている。ピロリン酸が骨型ALPの特異的な基質であれば、他のアイソザイムと比較してピロリン酸に対する親和性が高い、あるいは最大活性が高いなどの特徴を示す可能性があるという仮説のもとに、本研究を行った。

ALPは活性発現に亜鉛を必要とすることから亜鉛酵素とよばれ、亜鉛トランスポーターが重要な役割を果たしている。また、活性発現にはマグネシウムも必要とされALP活性測定の際には一般に反応液にマグネシウムが添加される<sup>1,2)</sup>。ALPを含んだ溶液にEDTA (ethylenediaminetetraacetic

<sup>1)</sup> 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目  
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 予防歯科学教室 (主任：本多 丘人 特任准教授)

<sup>2)</sup> 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目  
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 細胞分子薬理学教室 (主任：鈴木 邦明 教授)

acid) などの2価金属のキレート剤を添加すると活性が失われることから、ALP活性の維持に2価金属イオンの存在が必須であることは明らかであるが、EDTAによってキレートされ活性が消失する原因となるのが、ZnなのかMgなのかについての報告は見られない。1991年には、大腸菌ALPの結晶構造解析がなされ、1個のサブユニットあたり1個のMgと2個のZnの結合部位の存在が示された<sup>10)</sup>。さらに最近、ヒト胎盤型ALPの結晶構造の解析により1個のサブユニットあたり1個のMgとCa及び2個のZnの結合部位の存在が示され、Zn及びMgだけでなくCaの結合部位も明らかにされた<sup>11)</sup>。100年以上にわたって研究対象とされ、膨大な知識の集積がある酵素にかかわらずALP活性における各イオンの機能については不明な点が多い<sup>1, 2, 12)</sup>。構造が明らかにされているのはヒトの胎盤型と大腸菌のALPのみであり、骨型ALPでは明らかではないが、類似しているとする報告がある<sup>11, 12)</sup>。これらの2価金属イオンがどのようにALPの機能に関与するのかを明らかにする必要がある。

著者らはALPアイソザイムの生理的な基質と機能を明らかにすること、及び生理的な基質であれば至適pHが生理的な範囲に変化するののか否かを明らかにすることを目的に、4種のヒトALPを使用して種々の物質を基質とした際の基質に対する親和性の変化、pH依存性の変化と阻害剤に対する応答性の変化を検索してきたが、あるアイソザイムに特異的な基質あるいは至適pHを見いだすことはできなかった<sup>13-15)</sup>。そこで、ALPに結合するMg、CaあるいはZnによってALPの酵素としての特性が変化するのではないかと予測して本研究を行った。

## 材料と方法

### 1. ALP活性のMg、Ca及びZn濃度依存性

ALP活性の測定において、Mg存在下で測定されるALP活性をMg-ALP、Ca存在下で測定されるALP活性をCa-ALP、Zn存在下で測定されるALP活性をZn-ALPとする。ALP活性測定の反応液は、Chifflet法<sup>16)</sup>によるリン酸の定量において適切な吸光度を得ることができる量の各種ALP（骨型、肝臓型、胎盤型、小腸型）、最終濃度が25 mM sucrose、各実験結果に示した濃度となるMgCl<sub>2</sub>（Mg-ALP）、CaCl<sub>2</sub>（Ca-ALP）あるいはZnSO<sub>4</sub>（Zn-ALP）、pH 9.7の50 mM トリス塩酸緩衝液か炭酸緩衝液を含む溶液を250 µl作成し、37℃でプレインキュベーションした<sup>15)</sup>。Mg、Ca及びZnの相加的効果を調べる実験では、これらのイオンを各実験結果に示した濃度で組み合わせる反応液に添加して活性を測定した。反応は基質として2 mMとなるパラニトロフェニルリン酸（*p*-nitrophenyl phosphate, *p*-NPP）か5 mMとなるナトリウムピロリン酸（sodium pyrophosphate, Na-PPi）あるいは2 mMとなるアデノシン三リン酸（adenosine

triphosphate, ATP）を50 µl添加することにより開始し、60分後に20 mM のEDTAを300 µl添加することにより活性に必要な2価金属イオンをキレートして反応を停止した。酵素反応により生じた無機リンはChifflet法<sup>16)</sup>でモリブデンリンとして発色させた後、HITACHI U-2000分光光度計を用いて波長850 nmにおける吸光度を測定し算出した。実験は各測定点につきtriplicateで行った。あらかじめ20 mM のEDTAを添加した後に基質を添加しても測定される吸光度を、バックグラウンド値として実験の各測定値から差し引いた。反応液中の遊離型のMg、Ca及びZnの濃度はEGTA（ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid）との結合定数から計算した。

### 2. 各種ALP活性のpH依存性

反応液に添加するMgCl<sub>2</sub>（Mg-ALP）、CaCl<sub>2</sub>（Ca-ALP）あるいはZnSO<sub>4</sub>（Zn-ALP）の濃度を、それぞれ676 µM、100 nM及び0.77 pMとしたこと、各実験結果に示した種々 pHの50 mM トリス塩酸緩衝液か炭酸緩衝液を添加した以外は、上記1の実験と同様に行った。

### 3. 各種ALP活性の基質濃度依存性

ALP活性測定に使用する基質である*p*-NPP、Na-PPiあるいはATPの濃度を各実験結果に記載した種々の濃度で行ったこと以外は、上記1の実験と同様に行った。

### 4. 各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

反応液中に各実験結果に示した濃度のALP活性阻害剤であるlevamisoleあるいはtetramisoleを添加したこと以外は、上記1の実験と同様に行った。

### 5. 試薬

本実験はCALZYME社（San Luis Obispo, CA）から購入したヒト由来の骨型、肝臓型、胎盤型及び小腸型ALPを使用して行なった。その他の試薬は特級あるいは生化学用を使用した。

### 6. データ処理

一つの測定条件に対してtriplicateで測定した平均値と標準偏差を結果に示した。多くの測定点では標準偏差はシンボルの大きさの範囲に含まれた。

## 結 果

### 1. 骨型ALPのMg、Ca及びZn濃度依存性

骨型ALPのMg、Ca及びZnの濃度依存性をFig. 1a及び1bに示す。*p*-NPPを基質として測定するとMg及びCaでは濃度に依存して活性は増加し、それぞれ676 µM及び100 nMで最大となった。活性の50%活性化濃度（K<sub>0.5</sub>）はそれぞれ

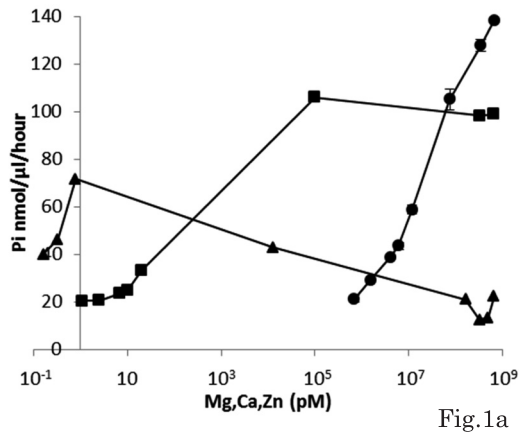


Fig.1a

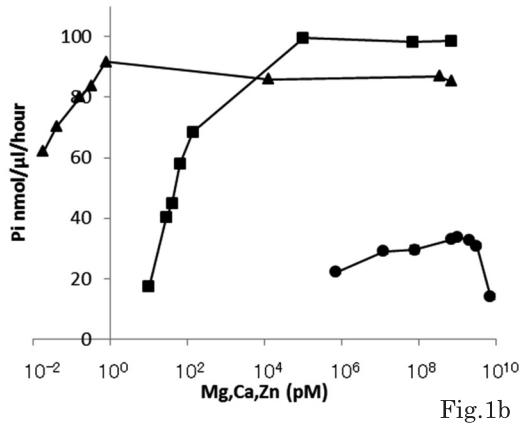


Fig.1b

Fig. 1aと1b ヒト骨型ALPのMg, Ca及びZn濃度依存性

ALP活性の測定は材料と方法に記載した方法で行った。2価金属として図に示した濃度の $\text{MgCl}_2$  (●),  $\text{CaCl}_2$  (■)あるいは $\text{ZnSO}_4$  (▲)を使用し, Fig.1aでは 50 mM炭酸緩衝液と基質は2mMとなる $p$ -NPP, Fig.1bではトリス塩酸緩衝液と基質は5mMとなるNa-PPiを使用した。一つの測定条件に対してtriplicateで測定した平均値と標準偏差を結果に示した。多くの測定点では標準偏差はシンボルの大きさの範囲に含まれた。

9.72  $\mu\text{M}$ 及び0.30 pMであった (Fig. 1a)。Znでは, 0.77 pMまで遊離Zn濃度依存性に活性が増大したが, さらに高濃度では逆に活性は抑制された。K<sub>0.5</sub>は0.1 pMであった (Fig. 1a)。Na-PPiを基質とすると, 活性はMg濃度に依存して増加して676  $\mu\text{M}$ で最大となり, 2 mM以上では活性の抑制がみられた (Fig. 1b)。また, 活性はCa及びZn濃度に依存して増加し, それぞれ100 nM及び6 pMで最大となった。さらに濃度を増加しても活性の抑制はみられなかった。

## 2. 骨型ALPによるMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALP活性のpH依存性

骨型ALPによる各ALP活性のpH依存性を, 上記1の実験において最大活性を与える676  $\mu\text{M}$  Mg, 100 nM Caあるいは0.77 pM Zn存在下で測定した (Fig. 2a及び2b)。 $p$ NPPを基質とすると, Mg-ALP及びCa-ALPが最大活性を示すpHは9.7であり, Zn-ALPでは9.5であったが最大活性を示

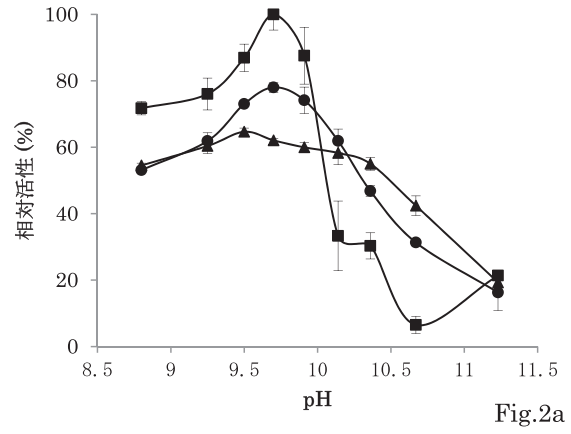


Fig.2a

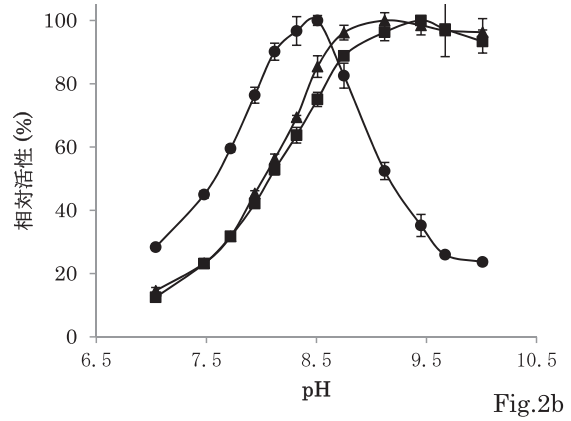


Fig.2b

Fig. 2aと2b ヒト骨型ALP活性のpH依存性

遊離Mg (●) 濃度を676  $\mu\text{M}$ , Ca (■) 濃度を100 nM, Zn (▲) 濃度を0.77 pMとしたこと, 実験結果に示したpHの50 mM炭酸緩衝液 (Fig. 2a) あるいはトリス塩酸緩衝液 (Fig. 2b) を使用した以外はFig.1a及び1bと同様に実験を行った。

すpHの範囲は広がった (Fig. 2a)。Na-PPiを基質とするとMg-ALP活性はpH 8.51で最大活性を示し, Ca-ALPはpH 9.45以上, Zn-ALP活性はpH 9.12以上の広いアルカリ性pHで最大活性を示した (Fig. 2b)。

## 3. 骨型ALP活性におけるMg, Ca及びZnの共存効果

Mg存在下のALP活性にCaあるいはZnを添加した際の活性の変化をFig. 3に示す。Mgのみの存在下で85 nmol Pi/ $\mu\text{l}$ /hourの活性が検出されたところでCaを添加すると, 活性は濃度に依存して増加し140 pMで約2倍に増加した。K<sub>0.5</sub>は6.6 pMであった (Fig. 3)。同様に, Mgのみの存在下で97 nmol Pi/ $\mu\text{l}$ /hourの活性が検出されたところで0.2 pM以上のZnが添加されると活性は180 nmol Pi/ $\mu\text{l}$ /hourに増加した。MgとCaあるいはZnを添加する順序を入れ替えて活性を測定しても, 同様の相加的な活性が観察された。また,  $p$ NPPを基質にしても同様の結果が得られた。しかし, CaとZnだけでは, 共存による活性の相加性は認められなかった (結果は示さない)。

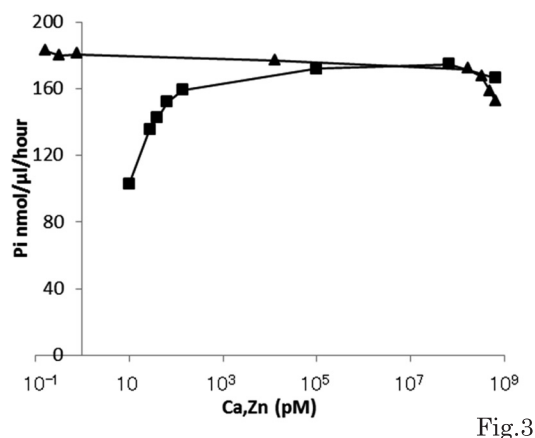


Fig.3

Fig. 3 ヒト骨型ALPのMg-ALP活性に対するCaあるいはZn濃度依存性

676  $\mu\text{M}$ の遊離Mgに、実験結果に示した濃度となる $\text{CaCl}_2$  (■)あるいは $\text{ZnSO}_4$  (▲)を添加したこと、及び基質を2 mMとなるNa-PPiにした以外は、Fig.1a及び1bと同様に実験を行った。

#### 4. $p\text{NPP}$ , Na-PPi及びATPが基質の際の各ALP活性のALP阻害剤感受性

$p\text{NPP}$ あるいはNa-PPiを基質としたMg, Ca及びZn-ALP活性はいずれもALPの阻害剤であるtetramisole及びlevamisoleの濃度に依存して90からほぼ100%阻害された (Fig. 4a,b, 表1).  $p\text{NPP}$ を基質とした場合の50%活性阻害濃度 ( $K_{i0.5}$ ) は、Mg, Ca, Zn-ALPの順にtetramisoleでは0.37, 0.42, 0.68 mM, levamisoleでは12.7, 32.8, 26.1  $\mu\text{M}$ であった。Na-PPiを基質とした場合のlevamisoleの $K_{i0.5}$ は、Mg, Ca, Zn-ALPの順に35.0, 31.8, 31.5  $\mu\text{M}$ であった。ATPが基質の場合も活性はtetramisole及びlevamisole濃度に依存して低下したが tetramisoleでは最大でも40%程度までしか活性は低下しなかった。 $K_{i0.5}$ は、Mg, Ca, Zn-ALPの順にtetramisoleでは0.31, 0.35, 0.53 mM, levamisoleでは39.4, 26.9, 21.3  $\mu\text{M}$ であった。

#### 5. 骨型ALPによるMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALP活性の $p\text{NPP}$ , Na-PPi及びATP濃度依存性

骨型ALPに対して親和性の高い基質を検索することを目的にMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALP活性の $p\text{NPP}$ , Na-PPi及びATP濃度依存性を測定した (Fig. 5a, b, c, 表2).  $p\text{NPP}$ に対して各ALP活性は類似した濃度依存性で増加した (Fig. 5a).  $K_{0.5}$ は、Mg, Ca, Zn-ALPの順に0.73, 0.45, 0.53 mMであり、最大活性は順に360, 282及び171 nmol Pi/ $\mu\text{l}$ /hourであった。Na-PPiに対してはCa-ALP及びZn-ALP活性と比較して、Mg-ALPでは高濃度のNa-PPiを必要とした (Fig. 5b).  $K_{0.5}$ は、Mg, Ca, Zn-ALPの順に1.49, 0.28及び0.16 mMであり、最大活性は48, 122, 117 nmol/ $\mu\text{l}$ /hourであった。ATPに対してもCa-ALP及びZn-ALP活性と比較して、Mg-ALPでは最大活性を示すのに高濃度のATPを必要とし

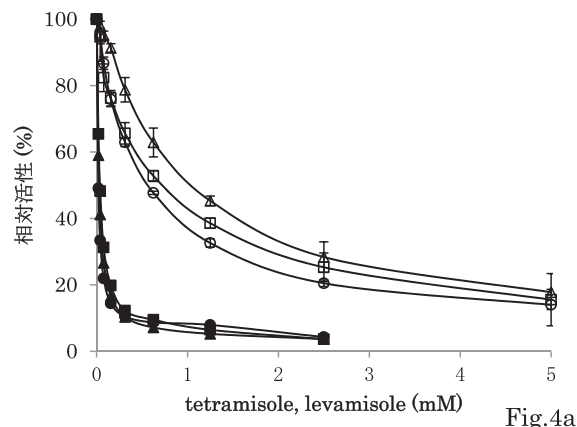


Fig.4a

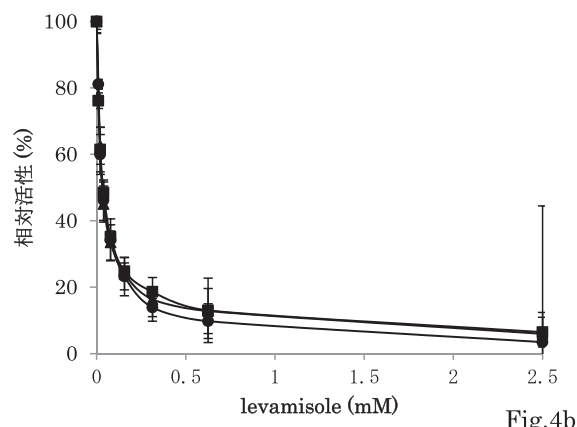


Fig.4b

Fig. 4aと4b 各種ALP活性のtetramisole及びlevamisole濃度依存性

実験結果に示した濃度となるtetramisole ( $\text{MgCl}_2$  (○),  $\text{CaCl}_2$  (□),  $\text{ZnSO}_4$  (△)) あるいはlevamisole ( $\text{MgCl}_2$  (●),  $\text{CaCl}_2$  (■),  $\text{ZnSO}_4$  (▲)) を添加したこと (Fig. 4a) 及びlevamisole ( $\text{MgCl}_2$  (●),  $\text{CaCl}_2$  (■),  $\text{ZnSO}_4$  (▲)) を添加したこと (Fig. 4b) 以外は、Fig.1a及び1bと同様に実験を行った。

表1  $p\text{NPP}$ , Na-PPi及びATPを基質としたALP活性の阻害剤感受性

|    | $\rho\text{NPP}$        |                       | Na-PPi                  | ATP                     |                       |
|----|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
|    | levamisole              | tetramisole           | levamisole              | levamisole              | tetramisole           |
|    | $K_{i0.5}(\mu\text{M})$ | $K_{i0.5}(\text{mM})$ | $K_{i0.5}(\mu\text{M})$ | $K_{i0.5}(\mu\text{M})$ | $K_{i0.5}(\text{mM})$ |
| Mg | 12.7                    | 0.37                  | 35.0                    | 39.4                    | 0.31                  |
| Ca | 32.8                    | 0.42                  | 31.8                    | 26.9                    | 0.35                  |
| Zn | 26.1                    | 0.68                  | 31.5                    | 21.3                    | 0.53                  |

た (Fig. 5c).  $K_{0.5}$ は、Mg, Ca, Zn-ALPの順に2.28, 2.93及び2.50 mMであり、最大活性は24, 29及び35 nmol/ $\mu\text{l}$ /hourであった。

#### 6. 各ALPアイソザイムのMg, Ca及びZn濃度依存性の相違

Fig. 1aに示したのと同様の実験を肝臓型、胎盤型及び小腸型ALPを用いて行った結果を、Mg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALPについて示した。Mg-ALP活性は肝臓型、骨型、胎盤型及び小腸型のすべてで遊離Mg濃度依存性に活性が増加し、676  $\mu\text{M}$ ではほぼ最大活性を示した (Fig. 6a)。

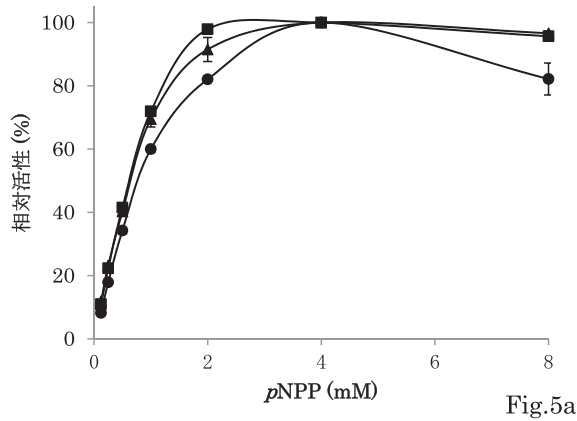


Fig.5a

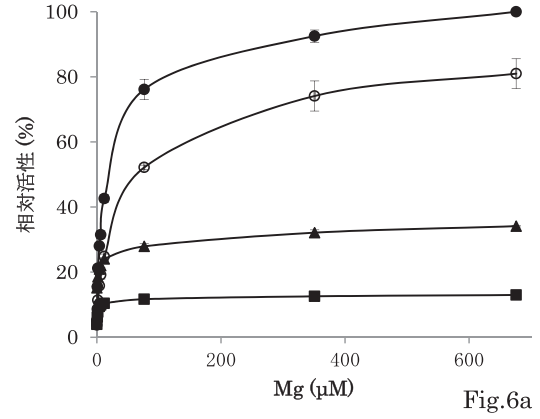


Fig.6a

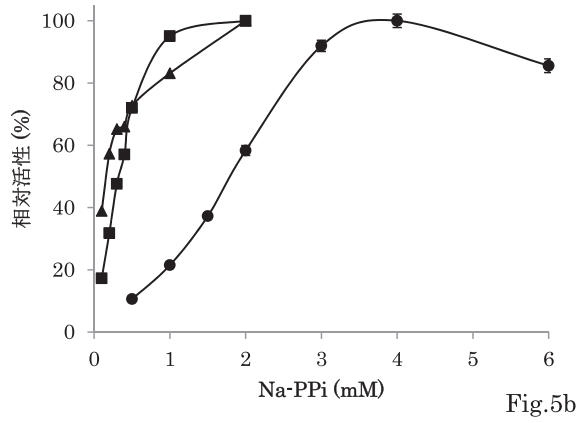


Fig.5b

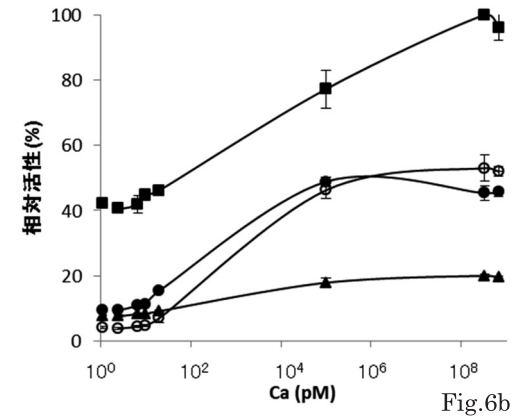


Fig.6b

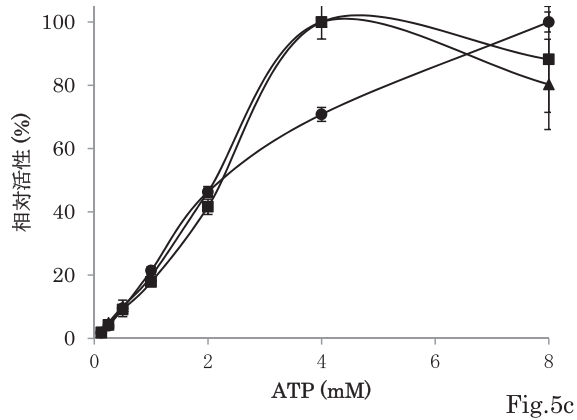


Fig.5c

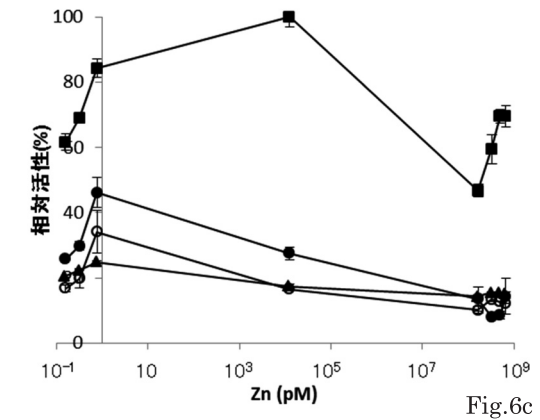


Fig.6c

Fig. 5aから5c 各種ALP活性のpNPP, Na-PPi及びATP濃度依存性

遊離Mg (●) 濃度を676 μM, Ca (■) 濃度を100 nM, Zn (▲) 濃度を0.77 pMとしたこと, 基質を実験結果に示した濃度となるpNPP (Fig. 5a), Na-PPi (Fig. 5b) あるいはATP (Fig. 5c) とした以外は, Fig.1a及び1bと同様に実験を行った。

表2 ALP活性のpNPP, Na-PPi及びATP濃度依存性

|    | pNPP                     |                               | Na-PPi                   |                               | ATP                      |                               |
|----|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|    | K <sub>0.5</sub><br>(mM) | 最大活性<br>(nmol Pi/<br>μl/hour) | K <sub>0.5</sub><br>(mM) | 最大活性<br>(nmol Pi/<br>μl/hour) | K <sub>0.5</sub><br>(mM) | 最大活性<br>(nmol Pi/<br>μl/hour) |
| Mg | 0.73                     | 360                           | 1.49                     | 48                            | 2.28                     | 24                            |
| Ca | 0.45                     | 282                           | 0.28                     | 122                           | 2.93                     | 29                            |
| Zn | 0.53                     | 171                           | 0.16                     | 117                           | 2.50                     | 35                            |

Fig. 6aから6c ALPアイソザイム活性のMg, Ca及びZn濃度依存性

骨型 (●) の他に肝臓型 (○), 胎盤型 (■) 及び小腸型 (▲) のALPアイソザイムを使用したこと以外は, Fig. 1aと同様に, Mg (Fig. 6a), Ca (Fig. 6b) あるいはZn (Fig. 6c) 濃度依存性を測定した。

表3 pNPPを基質としたALPアイソザイムのMg, Ca及びZn濃度依存性

|     | Mg                       |                               | Ca                       |                               | Zn                       |                               |
|-----|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|     | K <sub>0.5</sub><br>(μM) | 最大活性<br>(nmol Pi/<br>μl/hour) | K <sub>0.5</sub><br>(pM) | 最大活性<br>(nmol Pi/<br>μl/hour) | K <sub>0.5</sub><br>(pM) | 最大活性<br>(nmol Pi/<br>μl/hour) |
| 骨型  | 9.7                      | 138                           | 0.304                    | 106                           | 0.10                     | 72                            |
| 肝臓型 | 16.7                     | 112                           | 0.346                    | 115                           | 0.17                     | 53                            |
| 胎盤型 | 0.6                      | 18                            | 0.008                    | 216                           | 0.04                     | 155                           |
| 小腸型 | 0.2                      | 94                            | 0.006                    | 87                            | 0.03                     | 78                            |

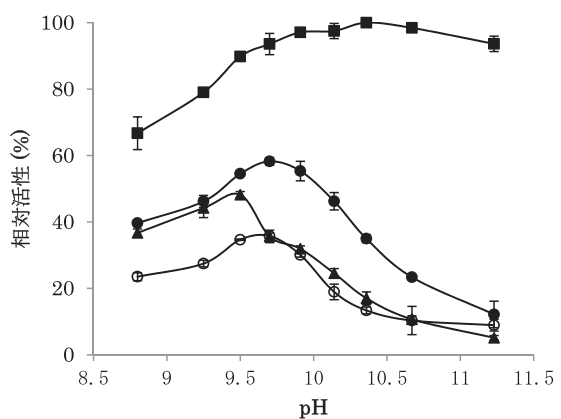


Fig. 7a

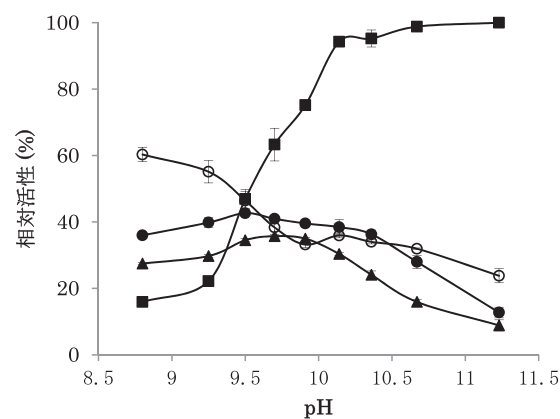


Fig. 7c

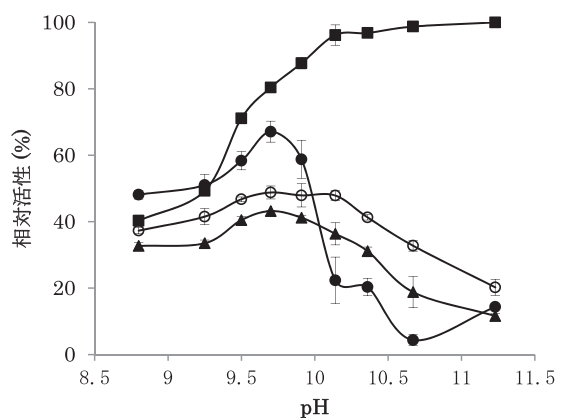


Fig. 7b

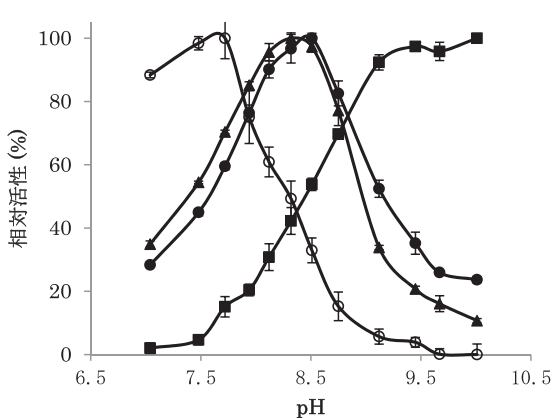


Fig. 7d

Fig. 7aから7d ALPアイソザイム活性のpH依存性

骨型(●)の他に肝臓型(○), 胎盤型(■)及び小腸型(▲)のALPアイソザイムを使用し, 基質はpNPP (Fig. 7aから7c)及びNa-Pi (Fig. 7d)を使用して, Fig. 2a及び2bと同様にALP活性のpH依存性を測定した.

Ca-ALP活性もすべてのアイソザイムで遊離Ca濃度依存性に活性が増加し, 肝臓型, 胎盤型及び小腸型は330  $\mu$ M, 骨型は100 nMではほぼ最大活性を示した (Fig. 6b). Zn-ALP活性は, 胎盤型は12.6 nMまで, 肝臓型, 骨型及び小腸型は0.77 pMまで, 遊離Zn濃度依存性に活性が増大したが, さらに高濃度では逆に活性は抑制された (Fig. 6c). それぞれの活性の $K_{0.5}$ 及び最大活性を表3に示した. pNPPに対する親和性はMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALPのいずれも小腸型が一番高く, 最大活性はMg-ALPでは骨型, Ca-ALP及びZn-ALPでは胎盤型が示した.

## 7. 各ALPアイソザイムのMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALP活性のpH依存性の相違

Fig. 2aに示したのと同様の実験を肝臓型, 胎盤型及び小腸型ALPを用いて行った結果を, Mg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALPについて示した. Mg-ALP活性が最大活性を示すpHは骨型及び肝臓型ではpH 9.7, 小腸型ではpH 9.5であった. 一方, 胎盤型は広い範囲のアルカリ性pHで高い活性を示した (Fig. 7a). Ca-ALP活性が最大活性を示すpHは骨型, 肝臓型及び小腸型ではpH 9.7であった. 一方, 胎盤型

は広い範囲のアルカリ性pHで高い活性を示した (Fig. 7b). Zn-ALP活性が最大活性を示すpHは骨型ではpH 9.5, 小腸型では9.7であったが, Mg-ALP及びCa-ALPと比較して幅の広いpH依存性を示した. また, 測定したpHにおいて肝臓型ではpH 8.8が最大であったのに対し, 胎盤型は広いアルカリ性pHで高い活性を示した (Fig. 7c).

Na-Piを基質として, Mg-ALP活性についてpH依存性を測定した結果を, Fig. 7dに示した. 最大活性を示すpHは骨型及び小腸型は8.5程度であったが, 肝臓型ではpH 7.5程度であり, 胎盤型ではpH 9.5以上のアルカリ性であった.

## 8. 各ALPアイソザイムの示すMg-ALP活性のNa-Pi濃度依存性

骨型ALPの生体内基質はNa-Piとされている. そこで, 比較のために胎盤型及び小腸型ALPの示すMg-ALP活性のNa-Pi濃度依存性を測定した結果をFig. 8に示す. 胎盤型及び小腸型ALP活性も骨型ALPと同様にNa-Pi濃度依存して増加し, 小腸型は4 mM, 胎盤型は6 mMではほぼ最大値を示した. Na-Piに対する $K_{0.5}$ は, 胎盤型では1.74 mM, 小腸型では1.52 mMであった.

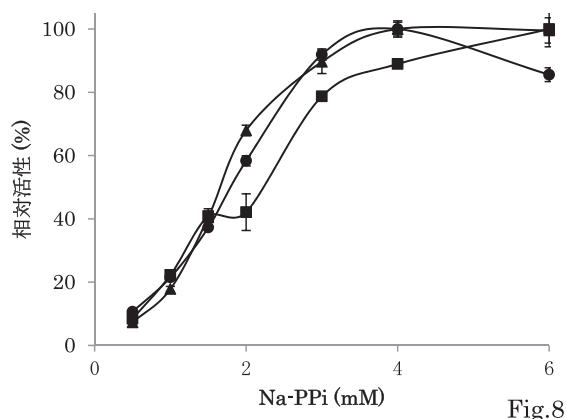


Fig.8

Fig. 8 Mg-ALP活性のNa-Pi濃度依存性

遊離Mg濃度を676  $\mu$ MとしてFig. 5bと同様にNa-Pi濃度依存性を測定した。骨型(●)の他に胎盤型(■)及び小腸型(▲)のALPアイソザイムを使用した。

## 考 察

### 1. 骨型ALPのMg, Ca及びZn濃度依存性

骨型ALP活性は $p$ NPPを基質として測定するとMg, Ca及びZn濃度依存性に増加して最大活性を示したが, Znでは0.77  $\mu$ Mで最大活性を示した後さらに高濃度では逆に活性は抑制された (Fig. 1a). Na-Piを基質とすると, 活性はMg, Ca及びZn濃度依存性に増加して最大活性を示したが, Mgでは676  $\mu$ Mで最大となり, 2 mM以上では活性の抑制が観察された (Fig. 1b). これらの結果はMg, Ca及びZnはそれぞれALP活性を発現させることを示すが, 共通の活性化部位に結合するのか, それぞれが独立して結合して活性化するのかについては明らかではない。そこで, 各2価金属が同じ部位で活性化するのではなく, 独立してALP活性を促進することが可能か否かを確かめるために, 骨型ALPを使用して, 2価金属を組み合わせて活性を測定することにより, 活性が相加的になるか否かを検討した (Fig. 3). その結果, 基質が $p$ NPPかNa-Piにかかわらず, MgとCaあるいはMgとZnを組み合わせて活性を測定すると, 活性はそれぞれのイオン単独で得られる最大活性の和となった。Mg, Ca及びZnが同じ部位に結合してALPを活性化するのであれば, 組み合わせても活性は相加的にはならないと予想され, それぞれが独立して活性化しうること示唆した。しかし, CaとZnのみの存在下では活性は相加的にならなかった。Caは大腸菌では結合部位が存在せずヒトで出現しており, 両イオンの機能が明らかにされる必要がある<sup>10-12)</sup>。

$p$ NPPを基質とした際にZnによるALP活性は0.77  $\mu$ Mで最大活性を示した後さらに高濃度では活性は抑制された (Fig. 1a). ヒトの骨型ALPも胎盤型と同様にZnの結合部位が2個存在すると予想されている<sup>11, 12)</sup> ことから, 1個目の結合部位へのZnの結合は活性を増大させるが, 2個目の

結合は活性の抑制に作用する可能性を示唆した。

骨型ALPで観察されたMg, Ca及びZnによるALPの活性化は, 肝臓型, 胎盤型及び小腸型ALPでも同様に観察された (Fig. 6a, b, c). これらの結果は, 構造解析の行われていない肝臓型及び小腸型ALPにおいても, Mg, Ca及びZnの結合部位が独立して存在することを示唆する。

各ALP活性を促進する2価金属の作用は肝臓型, 骨型, 胎盤型及び小腸型すべてで, Znが最も低濃度で促進し, ついでCa, そしてMgは最も高濃度を要した。Mg-ALPはすべてのALPでMgの濃度に依存して活性が増加し $K_{0.5}$ の値も類似していたが, Zn-ALPは小腸型以外は, ごく低濃度でALPを活性化した後さらに濃度が上がると活性は低下した。

### 2. 骨型ALPによるMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALP活性のpH依存性

ALP研究において, 一般に活性の至適pHは9から10とアルカリ性であり, 非生理的なpHである理由については解決されていない<sup>1, 2)</sup>。代表的な仮説は, 微小環境のpHがアルカリ性になるという説, 及び $p$ NPPなど生体には存在しない基質を使用して活性を測定するから至適pHがアルカリ性を示すのであり生理的な基質を使用するとより中性に近い至適pHで活性が測定されるという説である<sup>1, 2)</sup>。そこで, ALPを活性化するMg, Ca, Znによって至適pHが変化する可能性と, 人工的な基質である $p$ NPP及び骨型ALPの生理的な基質とされているPPiで比較することにより, 至適pHが変化する可能性を検討した。

$p$ NPPを基質として骨型ALP活性のpH依存性を測定するとMg-ALP及びCa-ALP活性の至適pHは9.7であり, Zn-ALPは最大活性を示すpHの幅は広がったがpH 9.5付近であった。一方Na-Piを基質とするとMg-ALP活性の至適pHは8.51前後であり, Ca-ALP及びZn-ALPはよりアルカリ性pHで最大活性を示した。骨型ALPの基質がPPiであるとする, Mgによって活性化される際には至適pHも1以上生理的な中性側に移動する可能性がある。

$p$ NPPを基質として肝臓型, 胎盤型及び小腸型ALPのMg-ALP (Fig. 7a), Ca-ALP (Fig. 7b) 及びZn-ALP (Fig. 7c) のpH依存性を測定すると, 胎盤型は他の骨型, 肝臓型及び小腸型と大きく異なり至適pHがよりアルカリ性であった。骨型, 肝臓型及び小腸型は肝臓型のZn-ALPを除いて9.7前後のpHで最大活性を示した。

Na-Piを基質として, Mg-ALP活性について肝臓型, 胎盤型及び小腸型ALPのpH依存性を比較すると, 至適pHは骨型及び小腸型は8.5程度であったが, 肝臓型ではpH 7.5程度と中性に近く, 胎盤型ではpH 9.5以上のアルカリ性であった。

ALP研究において常に疑問とされるpH依存性に関して, ALPアイソザイムの種類, 基質, 及び活性化する2価金属

の種類によって規則性を明らかにすることを目的に本研究を行ったが、統一的な結果を得ることはできなかった。多くの過去の報告<sup>1, 2, 17, 18)</sup>と本研究の結果から、ALP活性の至適pHはALPアイソザイムの種類だけではなく、基質の種類と存在する2価金属の種類によって影響されることを示唆する。また、本研究の過程で、炭酸緩衝液を使用するか、tris-HCl緩衝液を使用するかによっても、また、同じ緩衝液でもpNPPを基質とするかNa-Piを基質とするかによってもpHプロファイルが異なることが明らかになった。ALPの至適pHを検討する際には、人工的な緩衝液によってpH依存性を測定することになるが、ALPと各緩衝液との相互作用、あるいはALP活性測定に使用する基質と緩衝液との相互作用に関しては著者らの知る限り報告がみられない。より生体内に近い緩衝作用のもとでpHを変化させたALP活性の測定が必要とされる。

### 3. 骨型ALPの基質の検索

ALP活性の測定に頻用されるが生体内には存在しない人工的な基質であるpNPP、Na-Pi及びATPを基質として骨型ALPの示すMg-ALP、Ca-ALP及びZn-ALP活性の濃度依存性を測定した結果から (Fig. 5a, b, c, 表2), Na-Piを除いて、Mg-ALP、Ca-ALP及びZn-ALP活性は類似した濃度依存性で増加した。K<sub>0.5</sub>は、pNPPに対しては0.45から0.73 mM、ATPに対しては2.28から2.93 mMであった。Na-Piに対してはMg-ALPでは1.49 mM、Ca及びZn-ALPに対しては0.28及び0.16 mMであった。これらの結果は、骨型ALPがNa-Piを基質として利用する場合は、Znを2価金属として加水分解すると最も親和性の高い基質として利用可能であることを示唆する。最大活性は、pNPPに対しては171から360 nmol Pi/μl/hour、Na-Piに対してはMg-ALPでは48、Ca及びZn-ALPに対しては122及び117 nmol Pi/μl/hour、ATPに対しては24から35 nmol/μl/hourであった。これらから、ATPはALPにとって親和性も最大活性も低く効率の悪い基質であることを示唆する。また、骨型ALPがNa-Piを基質とする場合の最大活性という点からは、Mgで活性化されるよりCaで活性化される方が、より低濃度で最大活性を発揮することを示唆する。

pNPP、Na-Pi及びATPを基質としたMg-ALP、Ca-ALP及びZn-ALP活性はいずれもALPの阻害剤<sup>13-15)</sup>であるtetramisole及びlevamisoleの濃度に依存して抑制された (Fig. 4a,b, 表1)。pNPP及びNa-Piを基質とした場合、活性は90からほぼ100%阻害され、pNPPを基質とした場合のK<sub>i0.5</sub>はtetramisoleでは0.37から0.68 mM、levamisoleでは12.7から32.8 μMであった。また、Na-Piを基質とした場合のlevamisoleのK<sub>i0.5</sub>は31.5から35.0 μMであり一般的に報告されているALP活性が阻害される濃度範囲であった<sup>1, 2)</sup>。また、ATPが基質の場合もK<sub>i0.5</sub>はtetramisoleでは0.31から0.53 mM、levamisoleでは21.3から39.4 μMと一般

的なALP活性の阻害濃度<sup>1, 2, 13-15)</sup>であったが、tetramisoleでは最大でも40%程度までしか活性は低下せずATPが効率の悪い基質であることと関連する可能性がある。

骨型ALPの生体内基質はNa-Piとされていることから、比較のために胎盤型及び小腸型ALPのNa-Pi濃度依存性を測定したところ、胎盤型及び小腸型ALP活性も骨型ALPと同様にNa-Pi濃度に依存して増加し4 mMでほぼ最大値を示した (Fig. 8)。この結果は、Na-Piは*in vitro*では骨型ALPの特異的な基質とは言えないことを示唆する。本研究及びその他は<sup>1, 2, 17, 18)</sup>、基質に対する親和性はALPのアイソザイムの種類より、基質の種類によって決定されことを示唆する。

## 結 論

以上の結果は、*in vitro*でMg、Ca及びZnは独立してALP活性を促進することが可能であり、活性の至適pH及び基質に対する親和性は存在するイオンによって変化しうることを示唆した。この結果は、*in vivo*でもALPの生体内での機能がアイソザイムの種類による固有のものではなく、存在する2価金属イオンと基質の種類によって変化する可能性を示した。

## 参 考 文 献

- 1) McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S : Alkaline Phosphatase. Plenum Press New York and London : 373-487, 1979.
- 2) Millan JL: Mammalian Alkaline Phosphatases. 25-46, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 2006.
- 3) Weiss JM, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H : Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 263 : 12002-12010, 1988.
- 4) Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss JM, Harris H : Sequence and Characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 263 : 12011-12019, 1988.
- 5) Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M : Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. J Biol Chem 263:12020-12027, 1988.
- 6) Millan JL: Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatases. J Biol Chem, 261 : 3112-3115, 1986.
- 7) Orimo H: The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. J Nippon Med Sch, 77 : 4-12, 2010.

- 8) Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J: Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol*, 88 (3): 262-269, 2002.
- 9) Mornet E, Stura E, AS Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Menez A, Le Du MH: Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*, 276 : 31171-31178, 2001.
- 10) Kim EE, Wyckoff HW: Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two metal ion catalysis. *J Mol Biol*, 218 : 449-464, 1991.
- 11) Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, Menez A, Stura EA: Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J Biol Chem*, 276 : 9158-9165, 2001.
- 12) Le Du MH, Millan JL: Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 277 : 49808-49814, 2002.
- 13) Soory M, Suchak A : Effects of alkaline phosphatase and its inhibitor levamisole on the modulation of androgen metabolism by nicotine and minocycline in human gingival and oral periosteal fibroblasts. *Arch Oral Biol* 48 : 69-76, 2003.
- 14) Lin CW, Fishman WH : L-homoarginine : An organspecific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 247 : 3082-3087, 1972.
- 15) Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A : Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L-homoarginine and its regulation by subunit-subunit interaction. *Jpn J Pharmacol* 64 : 97-102, 1994.
- 16) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the detamination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases, *Anal Biochem* 168: 1-4, 1988.
- 17) Koshikawa M, Suzuki K, Sugawara Y, Iida J : Longterm effects of bisphosphonates on mineralization of osteoblastic cell, MC3T3-E1. *Oral Ther Pharmacol* 22 : 61-68, 2003.
- 18) 飯岡拓馬, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明 : ヒトアルカリ性ホスファターゼ・アイソザイムの阻害剤に対する感受性の相違. *北海道歯誌* 32 (2) : 202-209, 2012.

## ORIGINAL

# Effects of Mg, Ca, and Zn on human alkaline phosphatase activity

Junichi Hanya<sup>1)</sup>, Kuniaki Suzuki<sup>2)</sup>, Yoshitaka Yoshimura<sup>2)</sup>, Hajime Minamikawa<sup>2)</sup>  
Takashi Kanehira<sup>1)</sup> and Okahito Honda<sup>1)</sup>

### ABSTRACT :

**Objectives:** One Mg, one Ca, and two Zn binding sites per subunit of the human placenta type alkaline phosphatase (ALP) were detected by analyzing its crystalline structure. It was anticipated that other human ALPs also contain these ion binding sites, as there are few reports about the function of each of these ions on ALP activity. We examined the affinity of ALP isozymes for Mg, Ca, and Zn. Moreover, we also examined the effects of Mg, Ca, and Zn on the optimum pH for ALP activity and substrate specificity.

**Methods:** We utilized commercial human bone, liver, placenta, and small intestine type ALP, *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP), and Na-PPi as substrates, and assayed the Pi released from the substrates using the Chifflet method.

**Results and discussion:** 1) The ALP activity of all four isozymes increased in Mg, Ca, and Zn concentration-dependent manner with *p*NPP as the substrate. Remarkably, the 50% activated concentrations ( $K_{0.5}$ ) of each ion did not depend on the type of ALP and increased as the concentration of Zn, Ca, and Mg increased. Zn promoted the activity with a low concentration, but decreased it with a higher concentration, suggesting that the first Zn binding site stimulates activity but the second one inhibits it. The optimum pH for ALP activity varied according to the ion present. We observed that Zn, Ca, and Mg binding sites are present in all ALP. 2) The concentration dependency of Mg, Ca, and Zn on the bone ALP activity was examined using *p*NPP and Na-PPi as substrates. Its activity was promoted by Mg, Ca, and Zn in a concentration dependent manner, but the concentration dependency curve was different between *p*NPP and Na-PPi, suggesting that the affinity for Mg, Ca, and Zn depends on the substrate. 3) The activity increased remarkably when divalent cations were present in combination with Mg, Ca, and Zn, suggesting that each ion promoted ALP activity independently. 4) The ALP activity in the presence of each ion was inhibited in a concentration-dependent manner by specific ALP inhibitors such as levamisole and tetramisole. Moreover, the inhibition did not depend on the substrate used. 5) Substrate concentration-dependency of ALP activity was measured in the presence of Mg, Ca, and Zn. The  $K_{0.5}$  values were 0.73 mM, 0.57 mM, and 0.53 mM for *p*NPP with Mg, Ca, and Zn, respectively. The  $K_{0.5}$  values were 1.8 mM, 0.35 mM, and 0.15 mM for Na-PPi with Mg, Ca, and Zn, respectively. The affinity for the substrate of ALP varied according to the type of substrate but not to the type of ion.

**Conclusion:** Mg, Ca, and Zn possibly promote ALP activity independently. Our results suggest that the affinity for the substrate and the optimum pH could change depending on the ions present. It is possible that the function of ALP changes when divalent cations and a certain substrate is present.

**Key Words :** alkaline phosphatase, Ca, Mg, sodium pyrophosphate, Zn

<sup>1)</sup> Division of Preventive Dentistry (Chief : Associate prof. Okahito Honda), Department of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

<sup>2)</sup> Division of Cellular and Molecular Pharmacology (Chief : prof. Kuniaki Suzuki ), Department of Oral Pathobiological Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan